

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 61-056086

(43)Date of publication of application : 20.03.1986

(51)Int.Cl.

C12P 7/40
// C12P 13/00
(C12P 7/40
C12R 1:15)

(21)Application number : 59-176612

(71)Applicant : ASAHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 27.08.1984

(72)Inventor : KAWAKAMI KIYOSHI
IWASHITA HIDEMARO
MIMURA MORIO

(54) MICROBIAL PREPARATION OF ALPHA-HYDROXYACID AND ITS SALT

(57)Abstract:

PURPOSE: In the microbial preparation of an α -hydroxy acid or its salt, the titled substance useful as a raw material of food and pharmaceuticals is obtained from an α -hydroxynitrile by the action of microorganism belonging to Corynebacterium genus.

CONSTITUTION: A microbial strain belonging to Corynebacterium genus and capable of producing an α -hydroxy acid from an α -hydroxynitrile, e.g. Corynebacterium nitrilophylus, Corynebacterium sp. B-96, B-99, etc. is used in the present process. The microbial strain is cultured in a medium prepared by adding K, Mg, Mn, etc. to a medium containing a saturated nitrile compound as the sole carbon and nitrogen source or containing a saturated nitrile in combination with conventional carbon source and nitrogen source. The cultured product or the microbial cells separated therefrom are dispersed in water or in a phosphate-buffer solution, and an α -hydroxynitrile is added to the dispersion to obtain the corresponding α -hydroxy acid and ammonia.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-56086

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和61年(1986)3月20日

C 12 P 7/40
// C 12 P 13/00
(C 12 P 7/40
C 12 R 1:15)

8213-4B
8213-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 α -オキシ酸およびその塩の微生物学的製造法

⑯ 特 願 昭59-176612

⑰ 出 願 昭59(1984)8月27日

⑱ 発 明 者 川 上 潔 川崎市川崎区夜光1丁目3番1号 旭化成工業株式会社内
⑲ 発 明 者 岩 下 秀 磨 川崎市川崎区夜光1丁目3番1号 旭化成工業株式会社内
⑲ 発 明 者 三 村 精 男 富士市蛟島2番地の1 旭化成工業株式会社内
⑳ 出 願 人 旭化成工業株式会社 大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
㉑ 代 理 人 弁理士 清水 猛

明 細 書

1 発明の名称

α -オキシ酸およびその塩の微生物学的製造法

2 特許請求の範囲

コリネバクテリウム属に属し、 α -ヒドロキシニトリル化合物を加水分解する能力を有する微生物の作用により、 α -ヒドロキシニトリル化合物から対応する α -オキシ酸とアンモニアを生成せしめることを特徴とする α -オキシ酸およびその塩の微生物学的製造法。

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、微生物の作用により、 α -ヒドロキシニトリル化合物から対応する α -オキシ酸およびその塩の製造法に関するものである。生成した α -オキシ酸とアンモニアは、通常、 α -オキシ酸アンモニウム塩の形で存在しているが、 α -オキシ酸アンモニウム塩は、ほぼ理論量の強酸処理または熱分解処理等により、 α -オキシ酸として回収することが可能である。 α -オキシ酸のうち、

乳酸は食品用、醸造用、工業用として、グリコール酸は農薬、医薬原料として、 α -オキシイソ酪酸は有機合成原料として有用な化学物質である。(従来の技術)

ニトリル化合物が微生物により質化ないし分解されることは、アセトニトリル等(ジャーナル オブ ファーメンテーション テクノロジー (J. Ferment. Technol.) 47 巻, 631頁, 1969年)、 α -アミノニトリル(ジャーナル オブ ファーメンテーション テクノロジー 49巻, 1011頁, 1971年)、ベンゾニトリル(バイオケミカル ジャーナル (Biochemical Journal) 165巻, 309頁, 1977年)等が知られている。また、 α -ヒドロキシニトリル化合物の微生物学的加水分解による α -オキシ酸の製造法として、バチルス属、バクテリジウム属、ミクロコッカス属およびプレビバクテリウム属等の微生物を用いる方法(特公昭58-15120号)や、トルロブシス キャンディグ GN405 菌株を用いる方法(ジャーナル オブ ファーメンテーション テクノロジー 51巻,

393 頁, 1973年) が知られている。

(発明が解決しようとする問題点)

しかし、バチルス属、バクテリジウム属、ミクロコッカス属およびプレバクテリウム属等の微生物を用いる方法は、ラクトニトリルに対し十分な加水分解活性を示すが、微生物の寿命という点で、工業的に利用可能な寿命が認められていなかった。また、トルロブシス キャンディダ GN 405 菌株を用いた場合は、 α -ヒドロキシイソカプロニトリルに対する加水分解活性はごく僅かであり、また、 α -ヒドロキシイソバレロニトリルに対する加水分解活性も低く、工業的な反応活性が認められていなかった。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは、このような工業的な問題点の解決を目標にして、 α -ヒドロキシニトリル化合物を加水分解し、生成した α -オキシ酸が分解、還元されて消滅せず、さらに、長期間にわたって α -ヒドロキシニトリル化合物加水分解活性を失わない微生物の探索と培養および反応条件の研

究を鋭意行った結果、コリネバクテリウム属に属する微生物の中から選ばれた α -ヒドロキシニトリル化合物加水分解活性を有する微生物を見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、コリネバクテリウム属に属し、 α -ヒドロキシニトリル化合物加水分解活性を有する微生物の作用により、 α -ヒドロキシニトリル化合物から α -オキシ酸およびその塩を生成させることを特徴とする微生物による α -オキシ酸およびその塩の製造法である。

本発明で使用される α -ヒドロキシニトリルとしては、グリコロニトリル、ラクトニトリルおよびアセトンシアンヒドリンなどである。また、対応する α -オキシ酸としては、それぞれグリコール酸、乳酸および α -オキシイソ酪酸などである。

また、本発明で使用される微生物は、コリネバクテリウム属に属する微生物で、 α -ヒドロキシニトリルから α -オキシ酸を生産する能力を有するものであり、コリネバクテリウム ニトリロ

フィラス菌株 (*Corynebacterium nitrilophilus* ATCC 21419)、コリネバクテリウム スペシース B-96菌株 (*Corynebacterium* sp. B-96) およびコリネバクテリウム スペシース C-99菌株 (*Corynebacterium* sp. C-99) などを好適なものとしてあげることができる。

コリネバクテリウム ニトリロフィラス菌株はアメリカン タイプカルチャー コレクション (American Type Culture Collection: ATCC) に、また、コリネバクテリウム スペシース B-96菌株およびコリネバクテリウム スペシース C-99菌株は、それぞれ微生研国寄第7733号および7734号として微生物工業技術研究所に寄託されており、これらの菌学的性質は、以下に示すとおりである。なお、コリネバクテリウム ニトリロフィラス ATCC 21419 は、アセトニトリル等のニトリル化合物を還元分解する微生物として分離されたもので、その性質はジャーナル オブ ファーメンテーション テクノロジー 47 巻, 631 頁, 1969年に詳しく記載されている。

コリネバクテリウム スペシース B-96菌株

a. 形態

- ①細胞の形および大きさ 桿菌
2.1 ~ 2.4 × 3.6 ~ 5.5 μ m
- ②細胞の多形性の有無 分枝状および球状で顕著な多形性を示す。
- ③運動性の有無 無
- ④胞子の有無 無
- ⑤グラム染色性 陽性
- ⑥抗酸性 無

b. 各培地における生育状態

- ①肉汁寒天平板培養 円形、表面粗、全縁、中心突状、ピンク色、表面平滑、バター状、不透明。
- ②肉汁寒天斜面培養 生育中程度、糸状、表面は酸が多い、ピンク色、隆起状、波状。
- ③肉汁液体培養 厚いがもろい菌膜形成、透明またはわずかに混濁、沈渣あり。
- ④肉汁ゼラチン穿刺培養 酸化する、上部で生育最も良好。

⑤ リトマスミルク	変化しない。
c. 生理学的性質	
① 硝酸塩の還元	陰性
② MRテスト	陰性
③ VPテスト	陰性
④ インドールの生成	陰性
⑤ 硫化水素の生成	陰性
⑥ デンプンの加水分解	陰性
⑦ 無機窒素源の利用	陽性
⑧ 可溶性色素の生成	陰性 ただし、菌は ピンク色になる。
⑨ ウレアーゼ	陽性
⑩ カタラーゼ	陽性
⑪ セルロースの加水分解	陰性
⑫ 生育の範囲	pH 5~9、好ましくは6~8 温度18~39℃、好ましくは23~35℃
⑬ 酸素に対する態度	好気性
⑭ 糖から酸およびガスの生成	酸の生成 ガスの生成 ブドウ糖 + -

① 肉汁液体培養	厚いがもろい菌膜形成、 透明またはわずかに混濁、沈渣。
② 肉汁ゼラチン穿刺培養	液化せず、上部で 生育層も良好。
⑤ リトマスミルク	変化しない。
c. 生理学的性質	
① 硝酸塩の還元	陰性
② MRテスト	陰性
③ VPテスト	陰性
④ インドールの生成	陰性
⑤ 硫化水素の生成	陰性
⑥ デンプンの加水分解	陰性
⑦ 無機窒素源の利用	陽性
⑧ 可溶性色素の生成	陰性 ただし、菌は ピンク色になる。
⑨ ウレアーゼ	陽性
⑩ カタラーゼ	陽性
⑪ セルロースの加水分解	陰性
⑫ 生育の範囲	pH 5~10、好ましくは6~8 温度10~40℃、好ましくは25~35℃

麦芽糖	+	-
ショ糖	-	-
乳糖	-	-

コリネバクテリウム スペシース B-99菌株

a. 形態

① 細胞の形および大きさ	桿菌 0.7 ~ 1.2 × 1.2 ~ 1.7 μm
② 細胞の多形性の有無	分枝状で多形性を示す。
③ 運動性の有無	無
④ 胞子の有無	無
⑤ グラム染色性	陽性
⑥ 抗酸性	無

b. 各培地における生育状態

① 肉汁寒天平板培養	円形、表面粗、全縁、 中心突起、うすいピンク色、表面平滑、バ ター状、不透明。
② 肉汁寒天斜面培養	生育、糸状、表面は皺 が多い、ピンク色、隆起状、波状。

⑬ 酸素に対する態度 好気性

⑭ 糖から酸およびガスの生成

	酸の生成	ガスの生成
ブドウ糖	+	-
麦芽糖	+	-
ショ糖	-	-
乳糖	-	-

以上の菌学的性質をバージーの細菌分類書

(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)

第8版(1974)に基づいて分類すると、B-99菌株
およびC-99菌株は、グラム陽性、胞子形成能無、
非抗酸性、好気性で多形性を示す桿菌であること
から、コリネバクテリウム属に属する細菌である
と決定した。コリネバクテリウム ニトリロフィ
ラス ATCC 21419、B-99菌株、C-99菌株
は、スラントの外観や、生育条件およびニトリル
還元能などで差異がある。

本発明においては、通常、これらの菌株は1種
を用いるが、2種以上の混合菌体を用いてもよく、
さらに、上記菌株以外の同様な作用を有する菌株

を併用してもよい。

次に、本発明の一般的実施態様について説明する。本発明に使用される微生物の培養には、アセトニトリル、イソブチロニトリル等の飽和ニトリル化合物を唯一の炭素源、窒素源とするか、もしくはグルコース、アルドース等の炭素源、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム等の窒素源に、飽和ニトリルを炭素源、窒素源として共存させたものに、リン酸塩、カリウム、鉄、マグネシウム、マンガン、亜鉛等の無機栄養源などを適宜含有した培地が用いられる。また、飽和ニトリル化合物を全く添加しない培地を用いて培養し、培養途中に適宜ニトリル化合物を添加して培養を続けることにより、 α -ヒドロキシニトリル化合物の加水分解活性を持った菌体を取得することができる。培地のpHは通常5~9、好ましくは6~8、温度は通常20~35℃、好ましくは25~32℃で、1~5日間好氣的に培養を行なう。

このようにして得られた菌体培養物、それから分離した菌体およびその酵素抽出物を水またはリ

ン酸バッファー（例えばpH7~8）などの緩衝液に懸濁し、これに α -ヒドロキシニトリル化合物を共存させれば、速やかに加水分解反応が進行し、対応する α -オキシ酸とアンモニアを生成する。すなわち、通常、前記微生物菌体を1~10重量%、および α -ヒドロキシニトリル化合物を0.5~10重量%含む水性懸濁液を、温度5~35℃、pH5~10の条件を用いて、5分ないし24時間反応させればよい。また、反応に際して基質として用いる α -ヒドロキシニトリル化合物は、一般に生物毒性が強いので、反応系内の基質濃度は、反応を阻害しない程度の濃度にコントロールしつつ、逐次添加することができる。

かくして、 α -ヒドロキシニトリル化合物は、副生物である α -オキシ酸アミド化合物の生成がほとんどなく、ほぼ100%のモル収率で対応する α -オキシ酸とアンモニアに転換し、 α -オキシ酸アンモニウム塩の高濃度水溶液として生成密着させることができる。また、反応後、反応液と微生物菌体とを分離し、得られた微生物菌体を用い、

繰り返し α -ヒドロキシニトリル化合物の加水分解反応を行なうことができる。

なお、上記反応には、菌体または酵素を例えば、アクリルアミドゲルまたはアルギン酸カルシウムなどを用いる通常の固定化法にしたがって固定化し、使用することもできる。また、反応器型式に関しては、バッチ式、連続式または再使用式のいずれの型式を用いて行なうことも可能である。

(発明の効果)

本発明は、 α -ヒドロキシニトリル化合物の加水分解活性を有するコリネバクテリウム属に属する微生物を用いることにより、 α -ヒドロキシニトリル化合物をほぼ100%の収率で、対応する α -オキシ酸とアンモニアに転換することを見出したもので、常温、常圧という温和な条件下で反応が進行し、工業的に有利な α -ヒドロキシニトリル化合物の加水分解反応に応用できるものである。

(実施例)

次に、本発明を実施例により説明する。

実施例1

コリネバクテリウム ニトリロフィラス A.T.C.C 21419 を下記のA培地にて、24時間30℃で増殖培養した。

A培地	グルコース	1.0 %
	肉エキス	1.0 %
	ペプトン	0.3 %
	食塩	0.1 %
	イソブチロニトリル	0.5 %
	リン酸第一カリウム	0.1 %
	硫酸マグネシウム	0.05 %
	硫酸第一鉄	0.005 %
	硫酸マンガン	0.005 %
	硫酸アンモニウム	0.1 %
	硝酸カリウム	0.1 %
	pH	7.0

上記培養条件にて増殖した菌体を遠心分離により集菌し、乾燥菌体量として2重量%、ラクトニトリル2重量%、pH7.0に調整したリン酸バッファー液96重量%の反応液を調合し、30℃で反応

を開始した。反応開始後1時間でラクトニトリルは加水分解し、モル収率ほぼ100 %で乳酸アンモニウム塩が生成していた。また、乳酸アミドの生成はほとんど見られなかった。なお、生成物の分析は、反応終了後、固体を遠心分離により除去し、ガスクロマトグラフ法により乳酸および乳酸アミドを、ネスラー法によりアンモニアをそれぞれ定量した。乳酸アンモニウム塩は、ガスクロマトグラフ法では乳酸として検出された。

実施例2

コリネバクテリウム スペシース C-99を下記のB培地にて、24時間30℃で振盪培養した後、集菌し、さらにC培地にて24時間30℃で振盪培養を続けた。

B 培地	グルコース	1.0 %
	肉エキス	1.0 %
	ペプトン	0.3 %
	食塩	0.1 %
	p H	7.0
C 培地	イソブチロニトリル	0.5 %

実施例3

コリネバクテリウム ニトリロフィラス AT C C 21419 を実施例1と同様な培養条件にて増殖した固体を遠心分離により集菌し、乾燥固体量として1重量%、 α -ヒドロキシニトリル2重量%、p H 7.0、リン酸バッファー液97重量%の反応液を調合し、30℃で反応を行なった。 α -ヒドロキシニトリルとしては、グリコロニトリル、ラクトニトリルおよびアセトンシアンヒドリンを用い、それぞれ対応する α -オキシ酸であるグリコール酸、乳酸および α -ヒドロキシイソ酪酸への加水分解反応活性を比較した。なお、生成物である α -オキシ酸の分析は、反応液をそのまま用い、ガスクロマトグラフ法により行なった。結果を第1表に示した。なお、生成活性の定義はミルモール-生成物/グラム-乾燥固体量・時間である。

リン酸第一カリウム	0.1 %
硫酸マグネシウム	0.05 %
硫酸第一鉄	0.005 %
硫酸マンガン	0.005 %
硫酸アンモニウム	0.1 %
硝酸カリウム	0.1 %
p H	7.0

上記培養条件にて増殖した固体を遠心分離により集菌し、乾燥固体量として2重量%、グリコロニトリル1重量%、p H 7.0 に調整したリン酸バッファー液97重量%の反応液を調合し、30℃で反応を開始した。反応開始後30分でグリコロニトリルは加水分解し、モル収率ほぼ100 %でグリコール酸アンモニウム塩が生成していた。また、グリコール酸アミドの生成はほとんど見られなかった。生成物の分析は、実施例1と同様にガスクロマトグラフ法およびネスラー法で行なった。グリコール酸アンモニウム塩は、ガスクロマトグラフ法ではグリコール酸として検出された。

第1表

供試 α -ヒドロキシニトリル	α -オキシ酸生成活性
グリコロニトリル	29.3
ラクトニトリル	15.4
アセトンシアンヒドリン	0.173

実施例4

実施例2と同様にして調製したコリネバクテリウム スペシース B-96を乾燥重量として2重量%となるように、p H 7.0 に調整したリン酸バッファー液に懸濁した。これにラクトニトリルを1時間に2重量%の割合で連続的に滴下し、30℃で反応させた。4時間反応させた後、遠心分離により固体を除去し、得られた澄明液を分析したところ、乳酸濃度9.8 %であった。

実施例5

実施例4で得られたコリネバクテリウム スペシース B-96を用いた反応液から、遠心分離法

により固体を回収し、再びpH7.0 のリン酸バッファーに乾燥重量として2重量%となるよう懸濁して、実施例4と同様にラクトニトリルを連続的に滴下し、4時間反応させた。このような操作を合計5回繰り返したところ、第2表の成績を得た。

第2表

反応回数	生成乳酸(重量%)
第1回	9.8
第2回	10.1
第3回	9.3
第4回	9.9
第5回	9.5

(添加基質は1回の反応に対して8重量%)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.